

**SISTEMAS ALTERNATIVOS DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA SIMULTÂNEA DE ESPÉCIES COM INTERFERÊNCIA ESPECTRAL****Sandra Stets<sup>a</sup>, Barbara Duarte da Silva<sup>a</sup>, Talita Maria Tavares<sup>a</sup>, Gilcélia A. Cordeiro<sup>a</sup>, Noemi Nagata<sup>a</sup>, Christiana Andrade Pessoa<sup>b</sup> e Patricio Peralta-Zamora<sup>a,\*</sup>**<sup>a</sup>Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, CP 19081, 81531-980 Curitiba – PR, Brasil<sup>b</sup>Departamento de Química, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Av. Gal. Carlos Cavalcanti, 4748, 84030-900 Ponta Grossa – PR, Brasil

Recebido em 29/04/2015; aceito em 22/07/2015; publicado na web em 31/08/2015

ALTERNATIVE CALIBRATION SYSTEMS FOR THE SIMULTANEOUS SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF COMPOUNDS WITH OVERLAPPING ABSORPTION SPECTRA. Two simple and efficient procedures have been developed for the rapid simultaneous determination of compounds with mutual spectral interference (rifampicin (RIF) and isoniazid (INH)). The first method was based on the UV-Vis spectral signal (190–600 nm) of synthetic RIF and INH aqueous solutions, whereas the second method involved the visible spectral signal registered between 350 and 800 nm after the reaction of INH with a Cu<sup>2+</sup>/neocuproine complex. Both multivariate spectrophotometric methods show excellent prevision capacity, providing results that are statistically equivalent with those provided by the standard chromatographic procedure. The methods were validated according to criteria established by ANVISA, showing precision, accuracy and robustness compatible with the requirements for new analytical methods, additionally allowing the reduction of waste generation.

Keywords: electronic spectroscopy; overlapping absorption spectra; alternative calibration methods.

**INTRODUÇÃO**

Em função de características como elevada sensibilidade, rapidez, robustez e baixo custo, a espectroscopia eletrônica poderia fundamentar inúmeras aplicações analíticas de relevância. Infelizmente, a baixa seletividade da técnica usualmente implica sérios problemas de interferência espectral, o que com frequência impede a sua aplicação na determinação de espécies de interesse em matrizes complexas e, inclusive, de misturas de substâncias em matrizes mais simples.

Para contornar esses inconvenientes, sem a necessidade de técnicas de separação preliminar, vários sistemas de calibração menos convencionais têm sido propostos, dentre os quais se destacam o método de Vierordt's, fundamentado no princípio de aditividade da absorvância, métodos derivativos, geralmente associados ao ponto de anulação, e os sistemas de calibração multivariada, principalmente fundamentada em regressão por mínimos quadrados parciais (PLS). Grande parte desses métodos de calibração encontra importante aplicação no controle de qualidade de medicamentos, tal como ilustrado nos exemplos salientados a seguir.

Em 1999, Dinç<sup>1</sup> desenvolveu um método espectrofotométrico fundamentado no método de Vierordt's para a determinação simultânea de cafeína e paracetamol em comprimidos. Embora a interferência espectral seja severa, o método permitiu a obtenção de resultados análogos aos obtidos pelo método cromatográfico padrão. Um método similar foi proposto recentemente por Rajput *et al.*,<sup>2</sup> objetivando a determinação simultânea de claritromicina e ranitidina em ensaios de dissolução a partir de cápsulas bifuncionais.

Métodos fundamentados em espectrofotometria derivativa são utilizados desde os anos 1950, tornando-se mais populares a partir da década de 1970, época em que Shibata e colaboradores<sup>3</sup> publicaram um trabalho sobre espectrofotometria derivativa fundamentada em medições em dois comprimentos de onda. A partir desta data inúmeros trabalhos reportaram a determinação simultânea de fármacos, destacando-se,

recentemente, um estudo que objetivou a determinação simultânea de três antibióticos de uso oftálmico (cloranfenicol, dexametazona e nafasolina) por espectrofotometria derivativa de primeira ordem.<sup>4</sup> Neste estudo, o método espectrofotométrico permitiu resultados muito próximos aos obtidos por um método cromatográfico de referência.

Métodos quimiométricos têm sido utilizados desde a década de 1990 na área farmacêutica, principalmente para a quantificação de fármacos e produtos de degradação. Em 2014, Elkhoudary *et al.*<sup>5</sup> propuseram um método espectrofotométrico multivariado para a determinação de quatro fármacos (metronidazol, espiramicina, dioxanida e clioquinol) por várias técnicas multivariadas, incluindo PLS. O método foi validado, mostrando sensibilidade, precisão e exatidão compatíveis com a natureza da análise, com pouca interferência por parte dos excipientes. Estudos similares têm demonstrado a excelente potencialidade dos métodos de calibração multivariada, não apenas para determinação de misturas de fármacos,<sup>6</sup> mas também para a determinação de um fármaco na presença de produtos de degradação.<sup>7</sup>

Em alguns casos, simples reações de derivatização química podem levar à formação de espécies que absorvem na região do visível, o que diminui a interferência por parte de fármacos associados ou de componentes da matriz (excipientes), que costumam absorver fortemente na região ultravioleta. Dentro do contexto da análise de medicamentos, as reações de derivatização são relativamente comuns para facilitar a detecção após processos de separação cromatográfica.<sup>8</sup> Poucos trabalhos descrevem a derivatização química como alternativa para a análise de produtos farmacêuticos por espectroscopia eletrônica. Entretanto, destacam importantes aplicações que envolvem reações de derivatização fundamentadas em complexação<sup>9</sup> e oxidação.<sup>10</sup>

Métodos analíticos orientados à determinação espectrofotométrica desta associação foram propostos no final da década de 1990, recorrendo-se a sistemas de calibração fundamentados em espectrofotometria derivativa.<sup>11</sup> Mais recentemente têm sido propostas metodologias fundamentadas em processos de deconvolução e de funções trigonométricas de Fourier,<sup>12</sup> assim como sistemas multivariados fundamentados em PLS.<sup>13</sup>

\*e-mail: zamora@ufpr.br

No trabalho de Espinosa-Mansilla *et al.*,<sup>14</sup> um estudo comparativo foi realizado entre modelos elaborados por PLS-1 e uma modificação da análise linear híbrida (HLA/XS), objetivando a determinação de rifampicina, pirazinamida e isoniazida. Ambos os métodos permitiram a quantificação dos fármacos em medicamentos, com algumas restrições para isoniazida, em razão da sua baixa absorvibilidade relativa.

Neste trabalho, dois métodos PLS-2 foram avaliados em relação à determinação espectrofotométrica de rifampicina e isoniazida, sendo o primeiro desenvolvido utilizando a simples dissolução dos analitos em água ultra pura. Adicionalmente, foi avaliado um método colorimétrico precedido de reações de derivatização, mediadas por complexos formados entre íon cúprico ( $\text{Cu}^{2+}$ ) e neocuproína, objetivando-se uma maior seletividade que possibilite a aplicação do método na determinação de RIF e INH em amostras de urina.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Reagentes e medicamentos

Padrões de isoniazida (INH: 100,80%) e rifampicina (RIF: 99,70%) foram gentilmente fornecidos pelo Laboratório Farmacêutico Far-Manguinhos, da Fundação Oswaldo Cruz. Soluções de trabalho foram preparadas diariamente, utilizando-se água deionizada (Milli-Q® - 18,2 M $\Omega$ ) e vidraria analítica previamente calibrada.

Medicamentos contendo a associação em estudo (100 mg de INH + 150 mg de RIF e 200 mg de INH + 300 mg de RIF) foram gentilmente fornecidos pela Secretaria de Saúde do Estado do Paraná.

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

### Equipamentos

Espectros UV/Vis em solução foram adquiridos em espectrofotômetro Shimadzu (modelo 2410 PC), utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de caminho ótico. Para fins comparativos, espectros foram também registrados em espectrofotômetro Hewlett Packard (modelo 8452 A).

A análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foi realizada em um Cromatógrafo Varian 920-LC, equipado com coluna C18 (4,6 mm x 25 cm) e detector de arranjo de fotodiodos (238 nm). Como fase móvel foi utilizado fosfato de sódio dibásico: acetonitrila e sistema de eluição por gradiente, conforme método padrão de análise.<sup>15</sup> Curvas analíticas individuais foram preparadas a partir de padrões puros, cobrindo-se a faixa de 0,08 a 0,12 mg L<sup>-1</sup> para isoniazida (R: 0,997) e de 0,13 a 0,20 mg L<sup>-1</sup> para rifampicina (R: 0,995).

### Programas computacionais

Para a montagem de matrizes de dados utilizou-se o software Origin Pro 6.1® (OriginLab), enquanto que para a elaboração dos modelos empregou-se o programa PLS-toolbox 3.0 (Eigenvector Research, Inc.), que opera em ambiente Matlab v.6.5 (Math Work Inc.). Os gráficos de superfície de resposta foram construídos no programa Statistic 6.0 (StatSoft inc.).

### Desenvolvimento de modelos de calibração

#### Modelos convencionais

Para o desenvolvimento de modelos univariados convencionais foram elaboradas curvas analíticas individuais, no comprimento de onda de máxima absorção apresentado por cada fármaco (INH: 262 nm, RIF: 472 nm). Cada curva analítica foi composta de 5 valores de

concentração, cobrindo-se a faixa de 8,0 a 12,0 mg L<sup>-1</sup> para isoniazida, e de 12,0 a 18,0 mg L<sup>-1</sup> para rifampicina.

Modelos univariados foram também elaborados no modo derivativo. Neste caso, curvas analíticas para INH foram elaboradas nos comprimentos de onda em que RIF apresenta uma derivada da absorbância igual à zero (ponto de anulação). O mesmo procedimento foi utilizado para a elaboração das curvas analíticas de rifampicina.

#### Modelos multivariados sem reação colorimétrica com Cu(II) e neocuproína

Modelos multivariados de calibração (PLSR) foram desenvolvidos a partir de 28 misturas sintéticas, contendo 8,0 a 12,0 mg L<sup>-1</sup> de INH e 12,0 a 18,0 mg L<sup>-1</sup> de RIF, enquanto que outras 7 amostras foram reservadas para a fase de validação (Figura 1A). Nenhum tipo de planejamento de misturas foi utilizado para estabelecer o conjunto de calibração, sendo utilizado como único critério o teor dos fármacos nos medicamentos analisados e a variação máxima permitida, que costuma ser de 20%.

Os espectros foram registrados entre 190 e 600 nm, sendo processados após rotinas de centrar na média (CM), auto-escalamento (AU), alisamento pelo método Savitzky-Golay (SG) e alisamento com derivação (SG1<sup>a</sup>).

O número de variáveis latentes foi selecionado com base na minimização do erro relativo médio na validação cruzada (sistema *leave-one-out*), enquanto que a capacidade de previsão foi avaliada com um conjunto de sete misturas sintéticas, reservadas como conjunto de validação externa (amostras circuladas na Figura 1A).

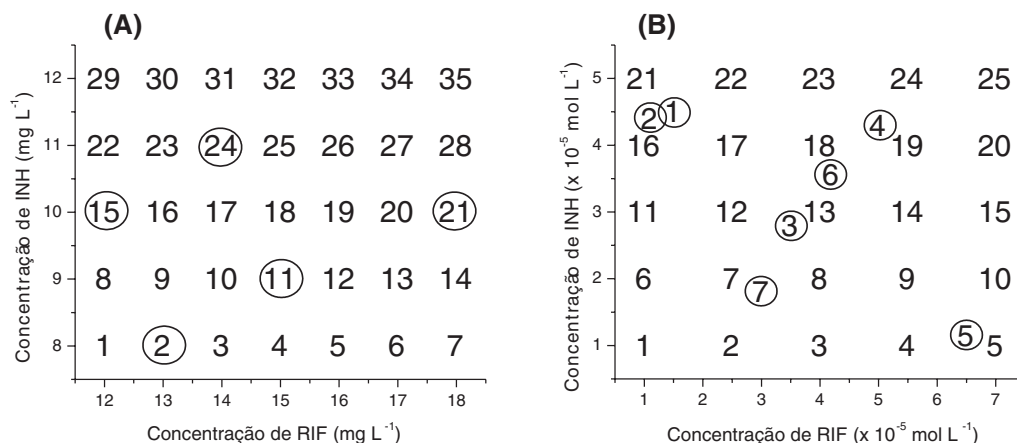
Na análise de amostras reais (medicamentos), 20 comprimidos (ou cápsulas) foram triturados e homogeneizadas em almofariz. Massas de aproximadamente 0,06 g foram tomadas e dissolvidas em 1.000,00 mL de água destilada. Desta solução foram tomados volumes de 20,00 a 50,00 mL, dependendo da concentração dos substratos em estudo, sendo finalmente diluídos até 100,0 mL. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

#### Modelos multivariados com reação colorimétrica com Cu(II) e neocuproína

Modelos multivariados de calibração (PLSR) foram desenvolvidos a partir de 25 misturas sintéticas, contendo 1,0 a 5,0 mg L<sup>-1</sup> de INH e 1,0 a 7,0 mg L<sup>-1</sup> de RIF, enquanto que outras 13 amostras, incluindo 3 triplicatas, foram reservadas para a fase de validação (Figura 1B). Em todos os ensaios foram adicionados 1000  $\mu\text{L}$  das soluções estoque de neocuproína ( $1,0 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> em metanol 10%) e  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  ( $1,0 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup>), utilizando-se tampão acetato (pH = 5,00) em todas as diluições.<sup>16</sup>

Para elaboração dos modelos multivariados, os espectros adquiridos na região do visível (350 e 800 nm) foram suavizados, utilizando-se o método Savitzky-Golay. A seleção do número de variáveis latentes foi realizada de acordo com o mesmo critério utilizado na elaboração dos modelos descritos no item anterior. Da mesma forma, a capacidade de previsão foi avaliada com um conjunto de sete misturas sintéticas, reservadas como conjunto de validação externa (amostras circuladas na Figura 1B).

Na análise de amostras reais (medicamentos), 20 comprimidos (ou cápsulas) foram triturados e homogeneizadas em almofariz. Massas de aproximadamente 0,06 g foram tomadas, dissolvidas em 10,00 mL de metanol, completando-se o volume com água até 100,00 mL. A seguir, uma alíquota de 1000  $\mu\text{L}$  foi transferida para balão volumétrico de 10,00 mL, adicionando-se 1000  $\mu\text{L}$  de solução de nitrato cúprico ( $1,0 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup>) e 1000  $\mu\text{L}$  de solução de neocuproína ( $1,0 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup>) e completando-se o volume com tampão acetato de sódio/ácido acético (pH 5,00).



**Figura 1.** Misturas sintéticas utilizadas para elaboração dos modelos multivariados fundamentados em espectroscopia eletrônica direta (A) e com reação de complexação utilizando neocuproína (B). Amostras em destaque (circuladas) correspondem ao conjunto de validação externa

### Validação de metodologias multivariadas

Ambos os modelos multivariados foram validados de acordo com os critérios estabelecidos pela ANVISA,<sup>17</sup> avaliando parâmetros de exatidão, precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) e robustez (tempo de leitura, temperatura e pH).

A precisão foi avaliada por análise em triplicata de três misturas sintéticas, contendo concentração baixa, média e alta. A repetibilidade foi avaliada por análises efetuadas pelo mesmo operador, no mesmo dia e utilizando-se o mesmo equipamento, enquanto que a reprodutibilidade envolveu a participação de um segundo analista e a utilização de um equipamento diferente (espectrofotômetro HP 8452-A). A precisão foi expressa na forma de desvio padrão relativo, considerando-se aceitos valores inferiores a 5%.

A exatidão foi avaliada por meio de ensaios de recuperação, utilizando-se as mesmas misturas sintéticas utilizadas na avaliação da precisão. A exatidão foi expressa na forma de erro percentual, considerando-se aceitos valores de recuperação entre 95 e 105%.

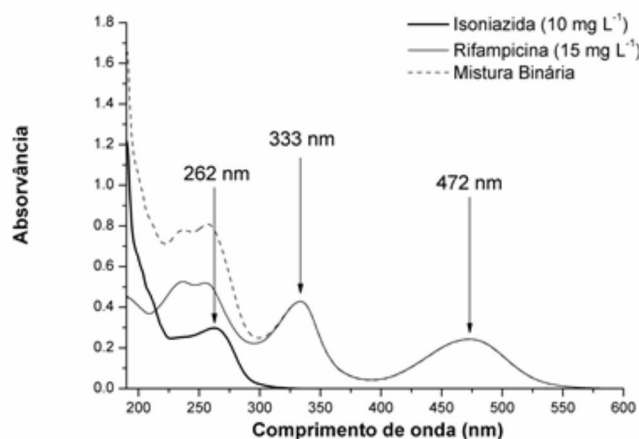
A avaliação da robustez envolveu estudos orientados a verificar o efeito do tempo de leitura, da temperatura e do pH. Estes estudos foram realizados com apenas uma mistura sintética, contendo 10,00 mg L<sup>-1</sup> de INH e 15,00 mg L<sup>-1</sup> de RIF.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Análise univariada convencional

A partir dos espectros das substâncias puras (Figura 2) é possível verificar que isoniazida apresenta apenas uma banda de absorção, centrada em 262 nm, a qual é intensamente interferida pelo sinal da rifampicina. Para este segundo fármaco observam-se duas bandas praticamente livres de interferência, centradas em 472 e 333 nm. Em primeira análise, a quantificação convencional de rifampicina parece possível utilizando-se o sinal registrado em 472 nm, enquanto que para isoniazida a necessidade de métodos diferenciados é bastante evidente.

Inicialmente, curvas analíticas convencionais foram elaboradas para cada fármaco, obtendo-se coeficientes de regressão (INH em 262 nm: 0,999, RIF em 472 nm: 0,998) superiores ao mínimo exigido pela ANVISA ( $r_{\min}$ : 0,99). Na análise das 7 misturas sintéticas reservadas para validação o método proporcionou erros médios de previsão da ordem de 200% para INH, por conta da forte interferência espectral ocasionada pela RIF. Para rifampicina a situação é completamente diferente, em razão da inexistência de efeitos interferentes por parte



**Figura 2.** Espectro eletrônico de soluções aquosas de padrões puros de isoniazida, rifampicina e da sua mistura

do segundo fármaco. Nestas condições, o erro médio de previsão é da ordem de 1% (Tabela 1).

Procurando aprimorar o modelo univariado, processos espectroscópicos derivativos foram avaliados. No modo derivativo, os máximos de absorção se transformam em pontos de inflexão em que a derivada da absorvância tem valor zero, para qualquer valor de concentração (ponto de anulação). Em função desta característica, uma curva analítica livre de interferência pode ser elaborada para RIF e INH, em 262 nm e 295 nm, respectivamente. Embora no modo derivativo o sinal espectral diminua drasticamente, curvas analíticas de qualidade foram conseguidas, com coeficientes de correlação da ordem de 0,99.

Finalmente, estudos de aplicabilidade do sistema fundamentado no princípio da aditividade das absorvâncias foram também desenvolvidos (método de Vierordt's), registrando-se os valores de absorvância para a mistura de substratos em 262 e 472 nm e resolvendo-se o sistema de duas equações apresentado a seguir:

$$A(262\text{nm}) = (a_{\text{INH},262\text{nm}} \times C_{\text{INH}}) + (a_{\text{RIF},262\text{nm}} \times C_{\text{RIF}}) \quad (1)$$

$$A(472\text{nm}) = (a_{\text{INH},472\text{nm}} \times C_{\text{INH}}) + (a_{\text{RIF},472\text{nm}} \times C_{\text{RIF}}) \quad (2)$$

onde: A: Absorvância, a: absorvidade (L mg<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>), C: concentração (mg L<sup>-1</sup>)

O método derivativo e o método fundamentado na aditividade de absorvâncias proporcionaram excelentes resultados na previsão das misturas sintéticas (Tabela 1), com erros relativos médios inferiores a 5%. Entretanto, na análise de medicamentos contendo a associação em estudo, apenas o sistema fundamentado no princípio

**Tabela 1.** Erros relativos médios na análise de misturas sintéticas e de medicamentos por aplicação de sistemas convencionais de calibração

Amostra	Erro relativo médio (%) <sup>1</sup>					
	Curva analítica Convencional		Método Derivativo		Método Aditivo	
	INH	RIF	INH	RIF	INH	RIF
<b>Misturas sintéticas</b>						
1	214,0	1,1	3,5	2,4	5,0	1,1
2	279,5	1,7	6,1	2,1	3,4	1,7
3	215,2	0,4	1,6	0,7	3,5	0,4
4	158,2	1,0	5,9	2,0	4,0	1,0
5	239,5	1,6	10,9	3,7	5,4	1,6
6	164,5	0,4	1,9	0,9	2,7	0,4
7	174,7	0,6	5,3	0,5	4,6	0,6
<b>Erro Médio (%)</b>	<b>206,5</b>	<b>1,0</b>	<b>5,0</b>	<b>1,8</b>	<b>4,1</b>	<b>1,0</b>
<b>Medicamentos</b>						
INH 100 mg + RIF 150 mg (A)	189,3	7,5	300,6	54,4	7,4	10,0
INH 100 mg + RIF 150 mg (B)	201,9	0,6	324,3	103,7	9,5	9,9
INH 200 mg + RIF 300 mg (A)	228,9	9,9	366,9	161,8	11,6	9,9
INH 200 mg + RIF 300 mg (B)	181,1	13,0	72,4	17,4	7,2	9,8
<b>Erro Médio (%)</b>	<b>200,3</b>	<b>7,8</b>	<b>266,0</b>	<b>84,3</b>	<b>8,9</b>	<b>9,8</b>

<sup>1</sup>Na análise de medicamentos, o erro relativo foi calculado em função da concentração expressa na bula. \*Os indicadores A e B representam diferentes lotes de produção.

da aditividade fornece resultados coerentes, com erros relativos médios inferiores a 10%.

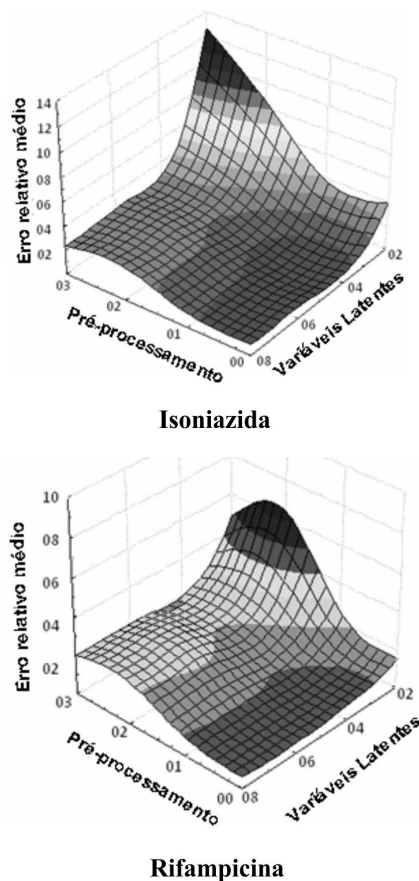
### Análise multivariada sem reação colorimétrica

Normalmente, a primeira decisão que deve ser tomada no processo de elaboração de modelos multivariados está representada pela seleção do número de variáveis latentes (VLs). Neste estudo, o critério adotado correspondeu à minimização do erro de previsão no processo de validação cruzada (sistema *leave-one-out*).

Para ambos os fármacos, o uso de 2 ou 3 VLs implicou significativa redução deste erro de previsão, ao passo que a introdução de novas variáveis pouco contribuiu com a melhora deste parâmetro. Adicionalmente, 2 VLs conseguem representar mais do que 99% da variância da matriz de concentração, valendo-se de 99,97% da variância dos dados espectrais. Embora a utilização de um elevado número de VLs represente riscos de superajuste, incluindo-se flutuações ou ruídos instrumentais, modelos foram desenvolvidos com 2, 3, 4, 6 e 8 VLs. Adicionalmente, 4 tipos de pré-processamento de sinais foram avaliados, incluindo-se dados centrados na média, para reduzir a dimensão dos modelos, autoescalados, para evidenciar sinais de menor intensidade, suavizados pelo filtro Savitzky-Golay (janela de 5 pontos e ajuste de polinômio de primeira ordem) para a remoção de ruídos aleatórios, e suavizados e derivados (derivada de primeira ordem) para remoção de deslocamentos sistemáticos da linha base.

Neste estudo, os menores erros de previsão foram proporcionados pelo processamento de dados centrados na média (pré-processamento 0), utilizando-se 4 a 8 VLs (Figura 3). Em função dos valores de erro relativo médio não terem sido considerados estatisticamente diferentes pelo teste de significância utilizado (teste t-Student), o modelo com 4 VLs foi selecionado para estudos posteriores, modelo este que permitiu erros médios de previsão inferiores a 1% na quantificação de ambos fármacos nas amostras reservadas para validação, assim como índices de correlação entre valores reais e previstos superiores a 0,99.

Na etapa de validação externa foi constatada uma excelente



**Figura 3.** Variação do erro médio de previsão no processo de validação cruzada (sistema *leave-one-out*) em função do tipo de pré-processamento e do número de variáveis latentes (pré-processamento 0: dados centrados na média, pré-processamento 1: dados autoescalados, pré-processamento 2: dados suavizados, pré-processamento 3: dados suavizados e derivados (1ª ordem))



correlação entre valores reais e previstos (Figura 4), o que demonstra um bom ajuste do modelo e a ausência de erros sistemáticos.

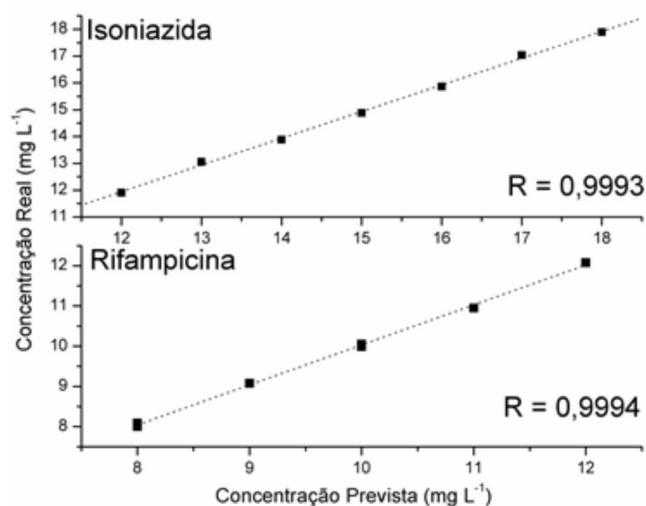


Figura 4. Gráfico de valores reais por previstos na fase de validação externa pelo modelo desenvolvido com espectros centrados na média e 4 VLs

Na análise de medicamentos (Tabela 2), o modelo multivariado proporcionou resultados coerentes com os resultados obtidos por aplicação do método cromatográfico padrão, com discrepâncias médias inferiores a 5% para ambos os fármacos.

#### Análise multivariada após reação colorimétrica de RIF e INH com Cu(II) e neocuproína

A reação colorimétrica química da INH foi fundamentada no seu efeito redutor sobre o complexo Cu(II)-neocuproína, o que leva à formação do complexo Cu(I)-neocuproína que absorve intensamente em 449 nm.<sup>16</sup>

Para elaboração do modelo multivariado foi utilizado um conjunto de calibração composto por 25 misturas sintéticas e espectros na região do visível (350 a 800 nm), pré-processados por alisamento. O modelo de melhor desempenho foi elaborado com 3 VLs, permitindo erros médios de previsão inferiores a 2% na fase de validação externa, assim como ausência de erros sistemáticos.

Na análise de medicamentos (Tabela 3) foi possível observar erros médios de previsão inferiores a 5%, tomando-se como referência os resultados obtidos pela técnica cromatográfica padrão. Cabe ressaltar que a utilização de reação colorimétrica propiciou maior seletividade do método, uma vez que permite a determinação dos analitos na região visível do espectro ultravioleta, permitindo a aplicação com sucesso na determinação de RIF e INH em amostras de urina humana conforme relatado em um trabalho anteriormente publicado.<sup>16</sup>

#### Considerações sobre os modelos multivariados desenvolvidos

Em primeiro lugar, é importante salientar que ambas as metodologias multivariadas foram validadas de acordo com os critérios definidos pela ANVISA, levando-se em consideração parâmetros de precisão, exatidão e robustez.

Neste estudo, foram observados desvios padrão relativos médios inferiores a 2%, tanto nos estudos de repetibilidade como de reprodutibilidade, o que se mostra compatível com as exigências da legislação (máximo de 5%).

A exatidão foi avaliada utilizando-se as mesmas misturas sintéticas utilizadas na avaliação da precisão. Os resultados indicam taxas de recuperação entre 99,0 e 102,7%, portanto, dentro dos limites estipulados pela legislação específica (5%). Adicionalmente, a exatidão foi avaliada pela análise de medicamentos, utilizando-se como referência os valores de concentração obtidos por aplicação da técnica cromatográfica padrão. Neste estudo (Tabelas 2 e 3), erros relativos médios inferiores a 5% foram observados.

Nos estudos de robustez, a capacidade de previsão dos modelos multivariados foi avaliada frente a controladas variações de

Tabela 2. Concentração dos fármacos em estudo em amostras de medicamentos utilizando-se método espectroscópico multivariado direto e cromatográfico padrão

Amostra	Concentração (mg g <sup>-1</sup> )				Erro (%)		
	Espectroscopia		Cromatografia		INH	RIF	
	INH	RIF	INH	RIF			
INH 100 mg+RIF 150 mg (A)	98,7	148,1	102,8	154,2	-4,2	-4,1	
INH 100 mg+RIF 150 mg (B)	110,2	150,1	101,5	152,1	+7,9	-1,3	
INH 200 mg+RIF 300 mg (A)	249,4	359,6	258,4	387,7	-3,6	-7,8	
INH 200 mg+RIF 300 mg (B)	250,8	355,8	253,4	380,1	-1,0	-6,8	
					<b>Erro médio (%)</b>	<b>3,3</b>	<b>5,2</b>

\*Os indicadores A e B representam diferentes lotes de produção.

Tabela 3. Concentração dos fármacos em estudo em amostras de medicamentos utilizando-se método espectroscópico multivariado e reação colorimétrica

Amostra	Concentração (mg g <sup>-1</sup> )				Erro (%)		
	Espectroscopia		Cromatografia		INH	RIF	
	INH	RIF	INH	RIF			
INH 100 mg+RIF 150 mg (A)	106,2	153,2	101,2	153,9	4,91	0,53	
INH 100 mg+RIF 150 mg (B)	109,2	169,7	108,7	165,5	0,46	-2,47	
INH 200 mg+RIF 300 mg (A)	205,0	299,0	212,4	304,9	3,57	1,96	
INH 200 mg+RIF 300 mg (B)	199,1	325,0	208,7	318,3	4,81	-2,06	
					<b>Erro médio (%)</b>	<b>3,44</b>	<b>1,80</b>

\*Os indicadores A e B representam diferentes lotes de produção.

temperatura, tempo de leitura e pH. Com relação aos dois primeiros fatores, é necessário antecipar que ambos os fármacos são sensíveis à ação da luz e do calor, podendo, inclusive, decompor em meio alcalino, em função de reações que parecem ser catalisadas por pirazinamida e etambutol, princípios comumente associados em medicamentos comercializados em outros países. Em função destes antecedentes, um estudo preliminar foi sistematicamente realizado, de maneira que pudessem ser definidas as condições e o tempo máximo de estocagem das soluções utilizadas como padrão. Nesta avaliação preliminar se observou uma significativa decomposição da rifampicina nos primeiros dias de estocagem, degradação oxidativa que, entretanto, pode ser evitada pela adição de ácido ascórbico. Adicionalmente, observou-se que a ação estabilizante do ácido ascórbico pode ser substituída pela estocagem no escuro e em baixas temperaturas, condição que foi adotada no decorrer de todo este trabalho. Nestas condições, os padrões aquosos de rifampicina se mantêm inalterados por pelo menos 7 dias, o que viabiliza a rotina de trabalho. As soluções de isoniazida apresentaram boa estabilidade em todas as condições de estocagem ensaiadas. Mesmo assim, a sua estocagem foi feita a baixas temperaturas e na ausência de luz, respeitando-se um prazo de validade de, no máximo, uma semana.

Nos estudos envolvendo a avaliação do efeito do tempo de leitura (0 a 6 horas) foi observada uma leve modificação do perfil espectroscópico da mistura de fármacos, principalmente em razão de modificações associadas à rifampicina. Uma vez que referida variação provoca desvios relativos da ordem de 2% entre as determinações realizadas no período de 6 horas, recomenda-se que as análises espectroscópicas sejam realizadas, no máximo, após 2 h do momento de preparo.

Nos estudos envolvendo a avaliação do efeito da temperatura (5 a 70 °C), significativas modificações espectrais foram observadas somente para rifampicina em temperaturas superiores a 50 °C. Por este motivo, recomenda-se que processos de dissolução sejam assistidos por ultrassom durante 30 minutos e por temperaturas não superiores a 40 °C.

Nos estudos orientados a avaliar o efeito do pH (4,0 a 9,0) foram observadas significativas mudanças espectrais somente em pH 4,0, tanto para isoniazida (pKa 1,8; 3,5 e 9,8) como para rifampicina (pKa 1,7 e 7,9), provavelmente em razão dos respectivos equilíbrios de protonação/desprotonação. Desta forma, recomenda-se a realização das análises entre pH 5 e 8, intervalo em que não foram observadas significativas mudanças espectrais nos fármacos em estudo.

Finalmente, é importante salientar que ambas as metodologias multivariadas foram comparadas entre si e em relação à metodologia cromatográfica padrão, utilizando-se testes para comparação de variâncias (teste f) e de médias (teste t). Nesta avaliação, diferenças estatisticamente significantes não foram observadas, considerando-se um nível de probabilidade de 95%.

## CONCLUSÕES

Sistemas convencionais de calibração fundamentados em curvas analíticas e sistemas derivativos se mostram ineficientes para a análise espectroscópica de associações contendo isoniazida e rifampicina, em função da interferência espectral existente entre estes fármacos. Por sua vez, o sistema fundamentado no princípio de aditividade de absorbâncias permite contornar referidos problemas de interferência, permitindo resultados relativamente coerentes com as informações de bula (erros médios da ordem de 9 a 10%).

Os modelos multivariados desenvolvidos apresentaram uma excelente capacidade de previsão, permitindo a obtenção de resultados equivalentes aos obtidos pela técnica cromatográfica padrão. Além de atender aos requisitos da legislação específica, os métodos multivariados se apresentam rápidos, econômicos e de fácil implementação, envolvendo uma geração de resíduos minimizada.

## REFERÊNCIAS

- Dinç, E.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, *21*, 723.
- Rajput, P.; Singh, D.; Pathak, K.; *Int. J. Pharm.* **2014**, *461*, 310.
- Shibata, S.; Furukawa, M.; Goto, K.; *Anal. Chim. Acta* **1973**, *65*, 49.
- Hoang, V. D.; Hue, N. T.; Tho, N. H.; Nguyen, H. M. T.; *Spectrochim. Acta, Part A* **2015**, *139*, 20.
- Elkhouady, M. M.; Salam, R. A. A.; Hadad, G. M.; *Spectrochim. Acta, Part A* **2014**, *130*, 222.
- Darwish, H. W.; Hassan, S. A.; Salem, M. Y.; El-Zeany, B. A.; *Spectrochim. Acta, Part A* **2013**, *113*, 215.
- Ali, N. W.; Abbas, S. S.; Zaazaa, H. E.; Abdelrahman, M. M.; Abdelkawy, M.; *J. Pharm. Anal.* **2012**, *2*, 105.
- Dar, A. A.; Sangwan, P. L.; Khan, I.; Gupta, N.; Qaudri, A.; Tasduq, S. A.; Kitchlu, S.; Kumar, A.; Koul, S.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *100*, 300.
- Paula, C. E. R.; Almeida, V. G. K.; Cassella, R. J.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 1664.
- Idris, A. M.; *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2007**, *56*, 330.
- Benetton, S. A.; Kedor-Hackmann, E. R. M.; Santoro, M. I. R. M.; Borges, V. M.; *Talanta* **1998**, *47*, 639.
- Youssef, R. M.; Maher, H. M. *Spectrochim. Acta, Part A* **2008**, *70*, 1152.
- Madan, J.; Dwivedi, A. K.; Singh, S.; *Anal. Chim. Acta* **2005**, *538*, 345.
- Espinosa-Mansilla, A.; Acedo Valenzuela, M. I.; Muñoz de la Peña, A.; Salinas, F.; Cañada Cañada, F.; *Anal. Chim. Acta*, **2001**, *427*, 129.
- [http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd\\_farmacopeia/pdf/volume2.pdf](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume2.pdf), acessada em março de 2015.
- Stets, S.; Tavares, T. M.; Peralta-Zamora, P.; Pessoa, C. A.; Nagata, N.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2013**, *24*, 1198.
- [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE\\_899\\_2003\\_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES), acessada em julho de 2015.